

IN SACCO METODE ODREĐIVANJA RAZGRADLJIVOSTI BJELANČEVINA HRANE IN SACCO METHOD IN ESTIMATION OF FEED PROTEIN DEGRADIBILITY

D Grbeša, Tajana Černy i Vesna Pavić

Pregledni znanstveni rad
UDK 636.2:636.085.34
Primljeno: 10. 10. 1992.

SAŽETAK

U ovom revijalnom radu opsežno se raspravlja o različitim čimbenicima koji utječu na razgradljivost bjelančevina i njenu procjenu in sacco metodom. Raspravlja se o bitnim postupcima metode koji se različito provode (priprema uzorka, porozitet vrećica, veličina uzorka, položaju vrećica u buragu, trajanju inkubacije, manipulaciji sa vrećicama, vrsti životinje, osnovnom obroku, brzini oticanja digesta iz buraga i izračunavanju efektivne razgradljivosti. Unatoč široko rasprostranjenoj upotrebi standardne metoda još nije prihvaćena. Iznose se i nedostaci ove metoda (čestice hrane se ne usitnjavaju mastikacijom i preživanjem, kontaminirane su mikrobnim proteinom, topivi protein nije uvijek i potpuno razgradljiv, razgradljivost ne prati uvijek krivulju kinetike prvog reda). Na temelju kritičkog pregleda literature iznosi se prijedlog standardne in sacco metode.

Ključne riječi: Značajke in sacco metoda, razgradljivost proteina, prijedlog standardne metode.

Uvod

Introduction

Razgradljivost (buražna probavljivost) bjelančevina i drugih hranjivih tvari može se ispitivati in vivo, in sacco i in vitro metodama. Naravno, in vivo metoda se smatra referalnom, te se rezultati dobiveni s ostale dvije metode kompariraju s njom.

U in vivo ispitivanju razgradljivosti bjelančevina potrebno je imati životinje sa buražnom fistulom i abomazalnom ili duodenalnom kanulom. Nadalje, mora se znati količinsko otjecanje krutog i tekućeg digesta iz buraga. Životinje moraju biti u N-ekvilibrijumu. U proteinu dospjelom u duodenum mora se razlučiti količina mikrobnog od nerazgrađenog bjelančevina hrane (bypaš protein) i endogenog protein. In vivo metoda indirektno mjeri razgradljivost bjelančevina. Sve ovo čini ovu metodu dugotrajnom, radno intenzivnom, neprikladnom za veliki broj istraživanja i skupom (Nocek, 1988; Walt i Meyer, 1988).

Zbog navedenih razloga intenzivno su se tražile jednostavnije, jeftinije i brže, ali istodobno i pouzdane metode procjene razgradljivosti surovih bjelančevina (SB).

Razvoj in situ metoda

Development of the in situ method

Ova metoda ili tehnika naziva se još sacco ili metoda vrećica od umjetnih vlakana.

Suspenzija najlonskih vrećica sa uzorkom hrane u buražnoj tečnosti proizašla je od tehnike svilenih vrećica koje su **Quina i sur., (1938)** koristili u proučavanju utjecaja osnovnog obroka preživača na probavu celuloze u buragu.

Kasnije je ova metoda korištena u istraživanju buražne konzumacije preživača (**Bailey, 1962; VanKeuren i Heiheman, 1962; Schoemann i sur., 1972**). **Mehrez i Orskov (1977)** počinju koristiti ovu metodu u procjeni kinetike razgradnje bjelančevina hrane u buragu preživača.

Ova metoda se je u zadnjem desetljeću intenzivno razvijala i istovremeno opsežno koristila u istraživanjima, te je bila osnovna metoda nekoliko hranidbenih sustava pro-

Darko Grbeša Zavod za hranidbu domaćih životinja Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Izv. prof. dr. Tajana Černy Zavod za hranidbu domaćih životinja Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dr. Vesna Pavić Zavod za specijalno stočarstvo Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

cjene proteinske vrijednosti krme i proteinskih potreba goveda (INRA-1987; NRC-1985; NKJ-1985; ARC-1980, 1984).

Prema Setala (1983) ova metoda se sastoji u slijedećem:

- pakiranje samljevenog uzorka hrane u porozne vrećice (in sacco) od najlona, poliestera, dacrona ili drugog materijala (umjetna vlakna) kojega ne probavljaju mikrobi buraga i ne mijenjaju mu se svojstva u uvjetima buraga.

- inkubacija vrećice u buragu (in situ) različitog trajanja

- nakon inkubacije, vrećice se peru, vadi ostatak uzorka, suši, važe i kemijski analizira.

- Implicitno je prihvaćeno da je ostatak uzorka u vrećici nerazgrađena hranjiva tvar

- nestanak hranjive tvari računa se kao razlika između količine i sastava uzorka prije i nakon inkubacije i predstavlja razgrađenu hranjivu tvar.

Opsežna istraživanja u Danskoj (118 uzoraka koncentratne i 44 uzorka voluminozne krme) pokazala su snažnu vezu ($R^2 = 0.79$) između in situ i in vivo određivanja razgradljivosti bjelančevina (Madsen i Hvelplund, 1985). Zinn i sur. (1981) su također ustanovili visoku korelaciju ($r = 0.98$) između in vivo i in sacco metode.

Tehnika najlonskih vrećica je jednostavnija u izvođenju od postprimalne kanulacije životinja. Ona je superiornija od laboratorijskih metoda jer uključuje probavne procese u buragu žive životinje (Setala, 1983).

Unatoč širokoj primjeni in situ metoda nije standardizirana, iako je Oldham (1986) na CEC-EAAP seminaru u Briselu predložio za diskusiju njene standardne postupke. Zato se na različite načine izvode pojedini bitni postupci ove metode, što na kraju djeluje i na pouzdanost dobivenih rezultata. Tako Straalen i Tamminga (1991) iznose da je između laboratorija prosječni koeficijent varijacije razgradljivosti SB 49 krmiva 32%, a kreće se od 7% za kožno brašno do 84% za pulpu citrusa. Naravno, nije samo metoda istraživanja uzrok ovako visokoj interlaboratorijskoj varijabilnosti. Međutim, važno je znati ograničenja metode radi njenog unapređenja i pravilne interpretacije rezultata.

Cilj ovoga kritičnog preglednog rada je prikazati faktore koji utječu na karakteristične postupke ove metode te predložiti standardnu metodu.

Priprema uzorka

Sample preparation

Priprema uzorka uključuje sušenje, mljevenje i prosijavanje. Lindberg (1991) iznosi da treba sušiti samo uzorke koji sadrže više od 15% vlage. Osobito je utjecajan način sušenja uzoraka zelene krme tri zelena krmiva sušili: zamrzavanjem u tekućem N, liofilizacijom, u sušioniku na 55 °C kroz 24 h ili 48 h na sobnoj temperaturi.

Liofilizirani uzorci imaju za 20% veću ($P < 0.01$) topljivost SB i 18.4% manje ($P < 0.01$) bypass SB nego neliofilizirani uzorci. Autori zaključuju da je sušenje zelene krme

zamrzavanjem pravilnije nego sušenje na sobnoj temperaturi ili 55 °C. Peyraud (1991) je sedam (7) silaža trava i kukuruza sušio na različite načine i ustanovio da je prosječna razgradljivost N liofiliziranih krmiva 81.8, sušenih na 60 °C kroz 24 h 76.2, a sušenih na 80 °C kroz 48 h 68.7%. Sušenje pri višim temperaturama dovodi do podcjenjivanja topljivosti i precjenjivanja sadržaja nerazgradljivog SB u svježoj krmi. Utjecaj sušenja na razgradljivost N dehidriranih, koncentratnih krmiva i krmnih smjesa nije toliko izraženo jer se ta krmiva tradicionalno konzerviraju snižavanjem vlage na 12–15%.

Izgleda da je oportuna liofilizacija zelene krme, silaža i vodenastih krmiva te dosušivanje sijena i ostalih krmiva na 60 °C kroz 48 sati jedino kada sadrže više od 15% vlage.

Prvi nedostatak ove metode je što sadržaj vrećica-krmivo nije usitnjeno žvakanjem i preživanjem već mljevenjem (Kennedy i sur., 1984). Mljevenje i prosijavanje materijala se provodi sa ciljem ujednačavanja veličine čestica hrane i oponašanja procesa usitnjavanja hrane u preživača, posebno voluminozne krme. Nadalje, mljevenje povećava dodirnu površinu uzorka i njegovu pristupačnost mikrobima buraga. Općenito, krupnije čestice hrane se sporije i varijabilnije razgrađuju nego sitnije.

Pošto se različito ponašaju čestice koncentratnih i voluminoznih krmiva Nocek (1988) predlaže da se čestice koncentrata melju sa Wiley mlinom na krupnoću 2 mm, a suhe voluminozne krme 5 mm. Zelena krma i silaže (< 60% ST) se trebaju prvo liofilizirati ili osušiti na 60–70% ST te zatim samljeti i prosijati kroz sito promjera 5 mm.

Suprotno tome Lindberg (1985) predlaže meljavu krupnoće 1–2 mm. Michalet-Doreau i sur. (1987) sugeriraju da je optimalna meljava krme u istraživanju razgradljivosti SB 0.8 mm. Peyraud (1991) konstatira da mljevenje čestica voluminozne krme na 0.8 ili 1.5 mm neutječe bitnije na razgradljivost SB. Gill i sur. (1966) su dobili da krave usitnjavaju čestice hrane na prosječnu veličinu između 1.2 i 1.6 mm.

Suglasno ovome i činjenici da većina istraživača koristi voluminozna krmiva samljevena na veličinu 2 mm, a energetskih i proteinskih koncentrata na 1 mm smatramo ove veličine optimalnim u ispitivanju razgradljivosti SB.

Velicina pora vrećica – porozitet

Bag porosity

U vrećici inkubiranoj u buragu trebaju biti isti mikro uvjeti kao i u okolnom mediju-buražnom sadržaju.

Porozitet je kompromis između rizika gubitka nerazgrađenih čestica hrane, otjecanja krutih čestica buražnog sadržaja te utjecanja i istjecanja tekuće faze u i iz inkubiranih vrećica. Nadalje, pore trebaju biti takve veličine da ne selekcioniraju ulaz i izlaz tipične mikropulacije buraga u/iz vrećica (Lindberg i Knutsson, 1981). Gubici materijala iz vrećica očituju se u mehaničkim izlascima čestica iz vrećica prije inkubacije i otjecanju otopljenih, ali ne i razgrađenih



čestica u prvim minutama inkubacije (> 15 min.). Generalno, što je veći porozitet to su proporcionalno gubici veći, ali se ta razlika smanjuje sa dužinom inkubacije (**Lindberg i Varvikko, 1982**). **Murphy i Nioletti (1984)** su istraživali utjecaj poroziteta vrećica od 40–102 odnosno 6–20 μm na razgradljivost N i ustanovili da je ona mnogo sličnija in vivo vrijednostima pri većem porozitetu...

Prema **Czerkawski (1986)** prosječni promjer bakterija buraga je 1.5 (0.3–5) μm , a protozoa 20 (10–50) μm , te porozitet zbog ovoga razloga ne bi trebao biti manji od 20 μm . Suglasno ovome **Meyers i Mackie (1986)** su našli da u vrećicama poroziteta 5 μm ima < 10%, a na vrećicama 53 μm ima 60% od ukupnog broja mikroba u buragu. **Marinnucci i sur. (1922)** su opsežnom istraživanju uspoređivali mikrouvjete u vrećici i buragu utvrdili da su uvjeti u vrećicama poroziteta 50 μm sličnim onima u okolnom mediju buraga. Također su ustanovili da je značajan utjecaj i vrste tkanja vrećica na uvjete u njoj. Naime, našli su da je razgradljivost ST i naročito SV veća u vrećicama od dacrona nego sljepljenih niti Tetko vlakana. Ekonomski gledano važno je znati koliko se puta jedna vrećica može koristiti u ispitivanjima. **Setala (1983)** preporučuje da se ona koristi 3–4 puta.

Prema **Maddox i Polan (1980)** iz vrećica poroziteta 50–150 μm znatno je odstranjivanje nerazgrađenih čestica nakon postinkubacionog perioda. Po nalazima različitih autora poželjni porozitet vrećica je: **Orskov (1982)** 20–40 μm , **Linberg (1985)** 20–40 μm , **Setala (1983)** 40 μm , **Sten i Satter (1984)** 52 μm , **Olderman (1986)** 35–40 μm , **Nocek (1988)** 40–60 μm , **Van Straale i Tamminga (1991)** 30–50 μm .

Iz iznesenog je vidljivo da bi se kao optimalni porozitet mogle uzeti pore veličine 40–50 μm .

Masa uzorka

Sample size

Masa uzorka koji se pakira u vrećicu također je kompromis između potrebe da ostane dovoljna masa uzorka za analizu nakon dugotrajne inkubacije (48 ili 72 h) i zahtjeva da su sve čestice uzorka dostupne mikroorganizmima buraga. Ovdje je bitan omjer između mase uzorka i površine vrećica-mg/cm². **Keuren i Heineman (1962)** su ustanovili da sa porastom mase uzorka u vrećici opada njegova razgradljivost u prvim satima inkubacije. **Uden i Van Soest (1974)** pokazali su da se probavljivost stanične stjenke smanjuje sa 54 na 38% kada raste masa uzorka sa 6.5 na 50 ST mg/cm². **Nocek (1985)** navodi da nema signifikantne razlike u razgradljivosti SB sojine sačme između 12.6 i 25.3 ST mg/cm².

Uzevši u obzir i prijedlog **Lindberga (1985)** može se smatrati da je optimalni omjer između mase uzorka i površine vrećica 10–20 mg ST/cm².

Olderman (1986) predlaže da je omjer između duljine i širine vrećice 1 : 1.5.

Položaj vrećica u buragu

Position of the bag in the rumen

Vrećice trebaju biti postavljene u buragu tako da je neometano njihovo slobodno kretanje u i sa buražnom tečnošću i da je omogućena slobodna izmjena tečnosti između vrećica i okoline.

Prema **Babniku (1989)** većina autora predlaže da se kesice vežu na 25 cm dugačke najlonske uzice kada se inkubiraju u buragu ovce, odnosno 50 cm u buragu krave. Drugi problem je mjesto inkubacije u buragu. Naime, **Balch i Johnson (1950)** iznose da je razgradljivost pamuka i sijena veća u ventralnom nego dorzalnom odjeljku buraga. **Stritzler i sur. (1990)** su ustanovili da sa porastom udaljenosti vrećica od kanule raste razgradljivost suhe tvari i mikrobna aktivnost mjerena koncentracijom ATP u vrećici. Razgradljivost suhe tvari sijena engleskog ljulja nakon 24 sata inkubacije u buragu krave iznosi 45.1 na uzici dugoj 25 i 74.4% na uzici dugoj 105 cm. (**Uden, 1978**) predlažu opterećenje vrećica radi njihova zadržavanje na istom mjestu u buragu. Suprotno ovome **Mehrez i Orskov (1977)** i **Lindberg (1985)** sugeriraju slobodno, naopterećeno kretanje vrećica u buragu. Razlog ovome je činjenica da opterećenje ne umanjuje varijabilnost razgradljivosti ST. Također je važno odrediti uniformnu dužinu uzice radi dobivanja usporedivih rezultata.

Pregledom citirane literature ustanovili smo da, gdje je to spomenuto, je dužina uzice 25 cm u fituliranih ovaca i 50 cm odraslih goveda, odn. da vrećica treba biti u ventralnoj vreći buraga.

Dužina inkubacije

Length of the incubation

Trajanje pojedine i svih inkubacija te njihov broj ovisi od vrste krmiva (koncentrati ili voluminozna) i hranjive tvari čija se razgradljivost istražuje. Za koncentrate se predlaže maksimalno 24 h, 72 h za suhu voluminoznu krmu, 96 h za grubu voluminoznu krmu i 48 h za zelenu krmu, silaže i sjenaze (**NKJ, 1985; Tisserand, 1989**).

Tamminga i Ketler (1986) određuju nerazgradljivi protein krme preživača kao % N koji je ostao u vrećici nakon 14 dana inkubacije. Isto tako i **Straalen i Tamminga (1990)** na osnovi istraživanja predlažu da inkubacija uzorka traje 10 dana. Po njima protein krme se dijeli u perivu frakciju (P), koja se ispere iz vrećica bez inkubacije u buragu, nerazgradljivi protein (NP), koji ostane u vrećicama nakon desetodnevnih inkubacije i netopivu razgradljivu frakciju (RP = P–NP).

Suglasno rečenom razgradljivost bjelančevina se ispituje kraće, a strukturnih vlakana duže vrijeme.

Intervali ili distribucija inkubacije ovise o dužini inkubacije. Tako **Nocek (1988)** predlaže da se uzorci u intervalu 0–6 h vade svaki 1 ili 2 h, u intervalu 6–24 h svaki 3 ili 6 h i > 24 h svaki 6 ili 12 h. **Michalet–Doreau i sur. (1987)** predlažu sljedeću učestalost vađenja vrećica 2–4–8–24 i 48 sati.

Vrsta životinje

Type of animal

Tehnika najlonskih vrećica koristi se u istraživanju buražne probavljivosti krava, junadi, junica, ovaca, koza i konja, a najčešće goveda i ovce (**Uden i Van Soest, 1984**).

Siddons i Paradine (1983) su uspoređivali razgradljivost istih krmiva u ovaca i junadi hranjenih sličnim obrokom (sijeno i sijeno: koncentrat) i dobili da ovce značajno više razgrađuju ST nego junad, ali je redosljed krmiva po visini razgradljivosti sličan. Suprotno ovome, kada koncentrat čini 50 i više postotaka ST obroka njegova razgradnja u buragu je nešto niža nego u goveda (**Fahmy i Sundstol, 1985; Boe 1989**). Ova razlika se može objasniti slabijim pufernim kapacitetom ovaca nego goveda (**Franklin i sur., 1981**). Međutim, **Priggs i sur., (1984)** su našli sličnu razgradljivost SB i ST između junadi i ovaca hranjenih voluminoznom obrokom. Po mišljenju **Poppi i sur., (1980)** osnovnu razliku između vrsta životinja uzrokovana je razlikama u dužini zadržavanja hrane u buragu.

Izgleda da je fiziologija buražne probave koncentratnog tipa obroka prilično različita između goveda i ovaca, te je upitna primjena rezultata istraživanja sa ovaca na intenzivno hranjena goveda.

Također je utvrđena značajna varijabilnost u razgradljivosti, naročito lignoceluloze, unutar životinja iste vrste **Demeyer i Dendooven (1987)** su utvrdili sljedeću razliku u razgradljivosti lignoceluloze soje 24 sata inkubacije 70.3–86.8%. Zato se u ispitivanju razgradljivosti treba koristiti 3 i više životinja, a vrećice stavljati u duplikatu za svaku inkubaciju (**Orskov, 1982**). Francuzi (**Michalet–Doreau i sur, 1987**) koriste dvije krave, ali se po inkubaciji stavljaju tri vrećice. U oba slučaja se dobije šest ponavljanja po inkubaciji, što je dovoljni broj za kasnije izračunavanje efektivne razgradljivosti.

Osnovni obrok

Basal diet

Obrok je glavni faktor koji određuje količinu i tip mikroba, a time i brzinu i obujam buražne probave hranjivih tvari.

Svaki pokus probavljivosti, pa tako i ispitivanja razgradljivosti, sastoji se od pripremnog (adaptacionog) i pokusnog (kolekcionog) perioda (**Cottyn i sur., 1989**). U pripremnom periodu životinje se prilagođavaju na novu vrstu krmiva, razinu i sastav obroka, uz istovremeno čišćenje probavnog trakta od ostataka prijašnjih obroka. Dok u istraživanju probavljivosti ispitivano krmivo mora biti sastavni dio obroka u in sacco metodi ono ne mora, ali je poželjno da bude komponenta osnovnog obroka. Osobito ako se radi o krmivu koje ima veći udjel u uobičajnom obroku (voluminozna krma i glavna energetska krmiva; kukuruz ili ječam). Kada se istražuje utjecaj strukture i razine obroka na razgradljivost SB životinje se moraju određeno vrijeme prilagođavati na njega. Dužina prilagodbe zavisi od oštine promjene obroka.

Prema **Schimannu (1981)** pripremi period traje: – 20 dana pri ostrim promjenama sastava obroka

- 10 dana pri normalnim promjenama sastava obroka
- 7 dana pri blagim promjenama sastava obroka.

Nakon pripremnog slijedi pokusni period u kojem se obično tri uzastopna dana provodi inkubacijom jednog krmiva u buragu iste ovce (**Orskov, 1982**).

Osnovni obrok obuhvaća nekoliko faktora koji utječu na razgradljivost.

Čini se da se na voluminoznom obroku razvija znatno brže odgovarajuća mikroflora predželudaca nego koncentratnom obroku (**Warner, 1965**). **Siddons i Paradine (1981 i 1983)** iznose da se razgradljivost SV i SB biljnih krmiva smanjuje sa porastom udjela energetskih koncentrata u obroku. U normalnom obroku preživača glavni izvori energije su ugljikohidrati, ovisno od toga da li je dominantna komponenta žitarice-škrob ili voluminozna krma – celuloza + hemiceluloza. Mikrobnog rasta je efikasniji na njihovoj kombinaciji nego njima kao pojedinačnim izvorima energije (**Mathers i Miller, 1981**).

Škrob, šećeri i pektini brže se metaboliziraju u buragu nego celuloza i hemiceluloza (**Hungate, 1966**). Visoko učešće šećera i škroba u obroku uvijek je povezano sa sniženjem pH buraga i promjenom celulolitičke u amilolitičku bakterijsku populaciju buraga (**Mann i Orskov, 1975**). Ove promjene uzrokuju opadanje in situ probave celuloze i SV (**Setala, 1983**).

U biti ovdje se radi o negativnom utjecaju asocijativnog efekta na razgradljivost strukturalnih ugljikohidrata (**Huhtanen, 1991**). Oštre promjene strukture obroka sa visoko voluminoznog na visoko koncentratni obrok uzrokuje i smanjenje razgradljivosti SB voluminozne krme (**Siddons i Paradine, 1981, 1983**). **Susmel i sur. (1988)** su dobili da dodatak 6% loja ili ulja povećava efektivnu razgradljivost sojine sačme, ali ne i silaže lucerne.

Mathers i Miller (1981) pretpostavljaju da je optimalna sinteza mikrobnog N, razgradnja ST i SB pri 70% učešću voluminozne krme u obroku. **Faria i Huber (1984)** iznose da porast udjela zrna kukuruza sa 0 na 60% u ST obroka ne mijenja značajnije in situ probavljivost ST silaže kukuruza, sijena lucerne i livadnog sijena.

Neznatan je utjecaj strukture obroka na razgradljivost animalnih krmiva (**Orskov, 1982**).

Zato je u laboratorijskom određivanju razgradljivosti potrebno standardizirati strukturu osnovnog obroka radi usporedivosti rezultata razgradljivosti ST, SV i SB. Kada se koriste fistulirane krave i junad onda se obrok sastoji od 30% koncentrata i 70% dobroga sijena (**Michalet–Doreau i sur., 1987**).

S druge strane kada se istraživanje razgradljivosti provodi s ovcama onda se predlaže samo sijeno ili isto kao kod goveda. Prema istom autoru sijeno treba sadržavati 11–12% SB/ST, a koncentrat 17–18% SB/ST. Kod obroka zasnovanog na voluminoznoj krmi treba imati na umu da je razgradljivost bjelančevina ispitivanog uzorka veća na obroku od zelene nego suhe voluminozne krme (**Van**



Straalen i Tamminga, 1990). Ovu pojavu navedeni autori objašnjavaju jačom proteolitičkom aktivnošću proteaza svježih nego sušenih krmiva.

U rutinskim istraživanjima životinje treba hraniti onakvim osnovnim obrokom kakvi se koristi u praksi dotične sredine (**Nocek, 1988**).

Smatramo da je slijedeći prijedlog **Schiemanna (1981)** za kemijski sastav obroka u ispitivanju probavljivosti optimalan i u ispitivanju razgradljivosti hranjivih tvari: surova vlakna ≥ 180 g/kg ST; surovi protein uključujući i NPN ≥ 120 g/kg ST do maksimalno 200 g/kg ST; surove masti ≤ 100 g/kg ST; sadržaj škroba ≤ 400 g/kg ST i mono- i disaharida ≤ 200 g/kg ST.

S obzirom na snažan utjecaj strukture osnovnog obroka na razgradljivost hranjivih tvari pojedinog krmiva potrebno je da on u svim istraživanjima sadrži jedno ili dva standardna krmiva (**Tisserand, 1989**). Također bi istraživano krmivo (naročito zelena krma, silaža ili sjenaža) trebalo biti komponenta obroka životinje.

Skandinavski i francuski normativi (**NKJ, 1985; Verite, 1987**) predlažu da se životinje hrane na uzdržnoj razini hranidbe, a američki (**Owens, 1985**) ad libitum ili na razini hranidbe koja odgovara praksi jer se time omogućuje primjenjivost dobijenih rezultata.

Brzina oticanja čestica iz buraga

Outflow rate of particles from the rumen

Najveći dio topljivih hranjivih tvari se brzo metabolizira u buragu. Većina nerazgrađenih tvari otiče iz buraga povezana sa krutim česticama hrane. Naravno, moguće je da vrlo sporo razgradljivi topivi protein i strukturna vlakna odlaze iz buraga kao tekuća faza (**Mangan, 1972; Krishnamoorthy i sur., 1982**).

U in situ istraživanju važna je brzina otjecanja nerazgrađenih tvari iz buraga, odn. dužina njihovog zadržavanja u buragu jer nam ona kazuje koliko tih tvari dospije u duodenum. Otjecanje čestica zavisi od dva procesa: mehaničkom i mikrobiološkom usitnjavanju čestica hrane i brzini otjecanja digesta. Brzina otjecanja digesta iz cijelog ili dijela probavnog trakta označava se s k u jedinici vremena h ili recipročno $1/k$, zadržavanje digesta u buragu sa h (**Orskov i McDonland, 1979**). Brzina otjecanja tekuće i krute faze buražnog sadržaja prvenstveno ovisi od razine hranidbe, s tim da je brzina otjecanja tekuće faze brža. Prema Brodercku i sur. (1991) omjer između oticanja krute i tekuće faze kreće se u rasponu od samo 1.7–2.2 (u prosjeku 2) pri visinama hranidbe od 1,1 do 4% od tjelesne mase). Razina hranidbe preživača varira između uzdržnih pa do pet puta iznad uzdržnih. Prema **Eliman i Orskov (1984)** pri razini hranidbe ovaca $0.5 k = 0.01$, a pri 2.0 $k = 0.039$. **ARC (1984)** iznosi da se k kreće od 0,02 ili 2% na sat pri niskoj razini hranidbe do 0,08 ili 8% na sat pri visokoj razini hranidbe (> 2.0) tovne junadi i visoko mlječnih krava. Skandinavski i francuski proteinski sistemi predlažu konstantnu brzinu pasaže od 0.08 i 0.06 za sve vrste obroka i razine

hranidbe (**Madsen, 1985; Verite i sur., 1987**). Pretpostavka da je brzina otjecanja digesta konstanta implicira da je protein krme istovrstan i da se razgrađuje istom brzinom (**Hobson i Jouany, 1988**). Ovo donekle može biti ispravno za koncentratna krmiva, ali ne i voluminozna gdje se protein čestice stanične stijenke razgrađuje sporije od proteina staničnog sadržaja. Ovo je također ograničavajući faktor in sacco metode. Na k utječu još i struktura obroka, krupnoća čestica hrane, njihova gustoća, brzina hidratacije, učestalost hranjenja i mikrobnost aktivnost na površini čestica (**Sutherland, 1986; Orskov i Miller, 1988**). U Cornell Net Carbohydrate/Protein system kao kriterij za procjenu pasaže digesta iz buraga uzima se masa krmiva (**Fox i sur., 1990**). Pri uzdržnoj razini hranidbe brzina pasaže se kreće između 1 i 3.5%/h, a na trostruko višoj razini od 2 do 6%/h.

Owens i Goetch (1986) izveli su slijedeće jednadžbe za izračunavanje brzine pasaže buražne tekućine, čestica koncentrata i čestica voluminozne krme:

$$y_E = 4.15 + 0.77kk + 2.32 kvk$$

$$y_M = 1.30 + 0.61kk + 4.88 kvk + 1.25kk$$

$$y_{VK} = 0.94 + 1.34kk + 1.24 kvk$$

gdje je y_E brzina otjecanja tekuće faze (%/h)

y_M brzina otjecanja čestica koncentrata (%/h)

y_{VK} brzina otjecanja čestica voluminozne krme (%/h)

kk konzumacija ST koncentrata (% od tjelesne mase), a kvk konzumacija ST voluminozne krme (% od tjelesne mase).

Kristensen i Weisbjerg (1991) su, na temelju podataka koje iznosi Lindberg (1985), utvrdili jednostavnu relaciju između razine hranidbe (g ST/kg tjelesne mase) i brzine otjecanja krutih čestica iz buraga.

Brzina otjecanja digesta (h^{-1}) = $k + 0.000864 \cdot$ razina hranidbe (k je prosječni koeficijent otjecanja digesta, i iznosi 0.00864). Osim karakteristika krmiva i obroka na brzinu otjecanja digesta utječu i osobitosti životinje: fiziološko stanje, vrsta i dob, tako da su individualne varijacije u razgradljivosti ST dosta visoke. Izražene koeficijentom varijacije iznose 2 – 25%, prosjek 12% (**Warner, 1981**). Stim da brzina otjecanja digesta ima snažniji utjecaj na razgradljivost ST, SB i SV u goveda nego ovaca i koza. Ovo je i razumljivo jer se goveda intenzivnije hrane nego ostali preživači (**Alam i sur., 1983**).

Pošto je direktno određivanje brzine pasaže složen postupak, a na nju utječu raznovrsni faktori, od kojih je najjači utjecaj razine hranidbe, predlažemo da se u izračunavanju efektivne razgradljivosti koristi formula **Kristensena i Weisbjerga (1991)**.

Vrećice se stavljaju u burag u vrijeme hranjenja životinja i od tada se mjeri dužina inkubacija (Lindberg, 1991).

Smatramo da bi u znanstvenim istraživanjima trebalo koristiti prijedlog Noceka (1988), sa time da se nerazgradljivi protein određuje po Straalena i Tamminge (1991).

Određivanje topivog proteina

Determining of the soluble protein

Topivi protein (frakcija a) se određuje na vrlo različite načine čime se dobiva velika razlika u količini topivog proteina. Zhang i Bunting (1991) su na 132 uzorka engleskog ljujla i aleksandrijske djeteline istraživali topivost N u 12 različitih otapala. Ustanovili da se ona kreće od 12.9% do 55.7% u ljujlu i 11.2 – 37.8% u djetelini ovisno od upotrijebljenog otapala. Svi francuski autori određuju topivi N ekstrakcijom u umjetnoj slini (bikarbonatfosfatnom puferu pH = 6.9) na način kako to propisuje Verite i Demarquilly (1976). Interesantan je prijedlog Madsen i Hvelplud (1991 – pismeno priopćenje) određivanja topivog proteina koji se sastoji u sljedećem. 1 g uzorka se pomiješa sa 40 ml destilirane vode (20 °C) i nakon 1h ispere sa 4 × 40 ml vode na bezdušični filter papir. Topivi protein je razlika između količine N u uzorku i ostatku na filter papiru. Većina autora uzima vrijednosti inkubacije od 2 h kao topivi protein Satala (1983).

Zbog jednostavnosti i lakoće izvođenja Madsen i Hvelplud (1991) tehnike poželjno bi ju bilo uzeti kao standardnu u određivanju topivog proteina.

Pred – i (post)inkubacijski postupci sa vrećicama

Pre and (post)incubation manipulation with the bags

Neki autori Nocek, 1988; Murphy i Nicoletti, 1984) predlažu da se vrećice prije inkubacije kvase u toploj (39 °C) vodi ili puferu kroz 15 min radi odstranjenja čestica hrane sitnijih od pora vrećice i na taj način odkloni greška u procjeni razgradljivosti ST, SB i strukturnih vlakana. Međutim, ovaj postupak nije šire prihvaćen jer se tako odstranjuje i 15–16% topive suhe tvari ječma (Figroid i sur., 1972) i 9.4–15.7% sijena (Lindberg i Kneutsson, 1981).

Uobičajno je pranje vrećica nakon inkubacije. Tim postupkom se odstranjuju bakterije, protozoe i gljivice koje su kolonizirale i povezale se sa česticama uzorka i zaustavlja njihova razgradnja. Nadalje, odstranjuju se razgrađene čestice i buražna tečnost. Ovo je osobito značajno u istraživanju razgradljivosti SB. Zato što mikrobnii protein može biti značajan dio nerazgrađenih bjelančevina (Lindberg i Varvikko, 1982). Standardno je prihvaćeno da se vrećice peru u hladnoj vodi sve dok iz njih neistječe bistra tečnost. Tamminga i sur. (1989) predlažu da se vrećice peru ručno ili u veš mašini sa hladnom vodom kroz 15 min bez centrifugiranja. Nocek (1988) predlaže da se vrećice peru u tekućoj hladnoj vodi – 90s/vrećici uz pažljivu manipulaciju. Van Soest (1983) sugerira da se uzorci nakon inkubacije peru u neutralnom detergentu kroz 16 sati, jer se na taj način

odstranjuju mikrobi vezani sa nerazgrađenim česticama hrane. Hof i sur. (1990) su usporedili tri postupka pranja vrećica nakon inkubacija i ustanovili da nema razlike u sadržaju aminokiselina između vrećica pranih u veš mašini ili neutralnom detergentu ili njihovoj kombinaciji. Općenito je prihvaćeno da je razgrađena ona količina bjelančevina koja je nestala iz vrećica nakon inkubacije. Međutim, Chen i sur. (1987) su našli da iz vrećica izlaze i peptidi koji za 3–5% jedinica mjenjaju efektivnu razgradljivost.

Na temelju iznesenog može se preporučiti pranje vrećica nakon inkubacija u standardnoj veš mašini u hladnoj vodi kroz 15 min bez centrifugiranja. Chorney i sur. (1990) su ustanovili da se u veš mašini može odjednom prati do 200 vrećica.

Mikrobna kontaminacija

Microbial contamination

Kontaminacija uzoraka nakon inkubacija mikrobnim N je daljnji nedostatak ove metode. Dio bakterijske populacije buraga je čvrsto povezan sa česticama hrane u vrećicama. Ukoliko bakterije nisu odstranjene ispiranjem one povećavaju količinu nerazgrađenog, odnosno smanjuje količinu razgrađenog bjelančevina. Bernard i sur., (1988) navode da mikrobnii N čini 14,6% nerazgrađenih bjelančevina zelenog engleskog ljujla. Michalet–Doreau i Ould–Bah (1989) iznose na temelju analize 51 uzorka voluminozne krme da mikrobna kontaminacija dovodi do podcjenjivanja stvarne razgradljivosti SB od 2 do 20 poena. Podcjenjivanje je veće (15 poena) u krmiva siromašnih proteinom (<8% SB) nego u krmiva bogatih proteinom (18% SB) kod kojih iznosi 8%. Autori također zaključuju da je podcjenjivanje sadržaja ragradljivog SB u voluminoznoj krmi zavisno od sadržaja SB i strukturnih ugljikohidrata. Naime, udjel mikrobnih bjelančevina u nerazgrađenom SB je niži pri većem sadržaju SB i obrnuto, viši pri većem sadržaju strukturnih ugljikohidrata. Iz navedenih razloga korekciju na mikrobnii protein treba vršiti samo pri inkubaciji voluminozne krme.

Visina greške zavisi također i od dužine inkubacije uzorka. Tako Nocek i Grant (1987) pokazuju da mikrobnii N uzrokuje precjenjivanje sadržaja nerazgrađenog N sijena mačjeg repka za 1% pri trajanju inkubacije 1 h i 30.6% pri trajanju inkubacije 24 h. Nocek (1989) predlaže da se mikrobna kontaminacija uzoraka krme, odobito nisko kvalitetnog sijena određuje pomoću nekih markera (diaminopimelične kiseline, ribonukleinske kiseline, NDV, ST i drugih).

Međutim, ovaj postupak je izrazito skup, te smatramo da bi se stupanj greške razgradljivosti N (Razgr.) uzrokovao mikrobnom kontaminacijom voluminozne krme mogao određivati po formuli Michalet–Doreau i Old–Bah (1989)

$$\text{Razgr.} = 6.4 - 0.365\text{SB} + 0.17\text{ONDV} \pm 1.9$$

gdje je Razgr. greška u razgradljivosti SB u %, SB sadržaj surovih bjelančevina (SB/ST) i NDV sadržaj strukturnih ugljikohidrata (%/ST).



Izračunavanje efektivne razgradljivosti bjelančevina Calculation of the effective degradability of protein

Orskov i Mehrez (1977) su utvrdili da dinamika razgradnje bjelančevina u buragu ima isti tok kao enzimatska kinetika prvog reda a koja se može najbolje opisati sljedećim matematičkim modelom koji ima oblik eksponencijalnom jednadžbom (**Orskov i McDonald, 1979**)

$$rp = a + b(1 - e^{ct}) \quad (1)$$

gdje je rp u istaživanju dobiveni nestanak SB iz vrećica u svakom periodu inkubacije (2, 4, 8, ... h) a , b i c su nelinearni parametri izračunati iz gornje jednadžbe i oni su specifični za svako pojedino krmivo i tip obroka. Fiziološki gledano da je u hladnoj vodi topljiva frakcija bjelančevina. b je netopivi, ali potencijalno razgradljivi SP, $a + b$ predstavljaju maksimalni obujam razgradljivosti, c je brzina razgradnje frakcije b surov bjelančevina u jednom satu, t je dužina inkubacije u satima i e je prirodni logaritam. Ova jednadžba ima slijedeće ograničenje da su $a + b \leq 100\%$. Iz ovako izračunatih parametara a , b i c , te izmjerena ili izračunata brzina otjecanja digesta (k) dobije se efektivna razgradljivost po formuli **Orskov i McDonald (1979)**. Efektivna razgradljivost bjelančevina (ERP)

$$ERP = a + bc/(c + k) \quad (2)$$

Proporcija frakcije b stvarno razgrađene u buragu određena je omjerom $c/(c + k)$.
Nerazgradljivi protein (NRP)

$$NRP = bk/(c + k) + (1 - (a + b)) \quad (3)$$

$1 - (a + b)$ predstavlja količinu proteina koja je ostala nerazgrađena u vrećici pri vremenu $t = \infty$.

Modeli 1, 2 i 3 su prihvaćeni kao standardni načini računanja (ne)razgradljivosti bjelančevina hrane u Velikoj Britaniji (**ARC, 1984**).

NRC (1985) model uzima da se bjelančevine hrane sastoje od tri frakcije (A, B i C). A i B frakcija su identične frakcijama a i b u **Orskov i McDonald (1979)** modelu. Razlika je u svojstvima frakcije C koja predstavlja potpuno neiskoristive bjelančevine u probavnom traktu tj. nerazgradljive u buragu i neprobavljive postruminalno, a prema ARC (1984) one mogu biti izvor aminokiselina za životinju domaćina nakon probave u tankom crijevu. Tako riblje i krvno brašno imaju dosta nerazgradljivog proteina koji je visoko probavljiv u tankom crijevu tj. sadrže malo neiskoristivog proteina (C). Po NRC efektivna razgradljivost proteina (ERP) se izračuna po formuli

$$ERP = A + B(k_{dB}/(k_{dB} + k_{pB})) \quad (4)$$

gdje su k_{dB} brzina razgradnje frakcije B, a k_{pB} brzina pasáže.

Nerazgradljivi protein (NRP)

$$NRP = B(k_{pB}/(k_{dB} + k_{pB}) + C) \quad (5)$$

Međutim, razgradljivost proteina ne prati u svim slučajevima oblik krivulje kinetike prvog reda (**Nocek i English, 1986**).

U situaciji prije početka degradacije (t_0) netopive frakcije ERP vrijednosti može se izračunati

$$ERP = a + b'c/(c + k) \exp-(c + k)t_0 \quad (6)$$

Mather i Miller (1981) predlažu model u kojem se konstanta brzine razgradnje bjelančevina (k_d) izrazi kao nagib regresije prirodnog logaritma ostatka bjelančevina u vrećici nakon inkubacija.

$$ERP = a + (1 - a)(k_d/k + k_d) \quad (7)$$

gdje je a protein nestao iz vrećica prije inkubacije – topivi protein pri $t = 0$, a k je brzina oticanja nerazgrađenog proteina iz buraga. Svi gornji modeli predpostavljaju da je a brzo topiva frakcija bjelančevina i određuje se na sličan način, te da je $a + b = 100$.

Kristensen i sur. (1982) predlažu drugačiji model računanja ERP na sljedeći način.

$$EPD = \sum [RP(t_i + 1) - RP(t_i)] (f(t_i + 1)) \quad (8)$$

Posljednja jednadžba traži poštivanje sljedećih uvjeta: distribucija inkubacija treba biti takva da prva inkubacija bude dovoljno kratka (< 2 h) radi pravilne procjene topljivih bjelančevina (a), a posljednja dovoljno dugačka (72 ili 96 h) da se dobije maksimalna razgradljivost netopivih bjelančevina – b (**Dhanoa, 1988**). Sporo razgradljivi protein nema tok razgradnje koji opisuje eksponencijalna jednadžba enzimatske kinetike prvog reda. Sporo razgradljive bjelančevine nemaju tok razgradnje koji opisuje eksponencijalna jednadžba enzimatske kinetike prvog reda (**Robinson i sur., 1986**). Stoga autori predlažu da posljednja inkubacija traje 9 – 14 dana, a što prihvaćaju i drugi nizozemski znanstvenici (Vuuren i sur., 1990; Stralen i Tamminga 1990). Prema njima bjelančevine krme se dijele u perivu frakciju (P) – koja se ispere iz vrećica prije inkubacije, nerazgradljivi protein (NP) koji ostane u vrećicama nakon 10 d inkubacije – isti je kao frakcija C u NRC modelu, netopivi razgradljivi protein (RP) koji se izračuna prema formuli

$$RP = 100 - (P + NP) \quad (9)$$

ERP se izračuna prema jednadžbi 4., u kojoj se c izrazi kao brzina razgradnje proteina do 10 d inkubacije, k je konstantna brzina pasáže 0.06/h. Omjer između c i k (c/k) odražava uvjete razgradnje RP.

$$ERP = A + B[c/c + k]^k \quad (10)$$

Stoga je model **Orskova i McDonald (1979)** prihvatljiviji u izračunavanju efektivne razgradljivosti bjelančevina stočne hrane jer pretpostavlja da je nerazgradljivi protein djelom probavljiv u tankom crijevu.

Opisani, kao i drugi, matematički modeli dinamike razgradnje i izračunavanja efektivne razgradljivosti su pojednostavljena stvarnost i temelje se na dva esencijalna obilježja: (1) proteini hrane se sastoje od frakcija različite razgradljivosti i (2) nestanak proteina iz vrećica je rezultat istovremene razgradnje i pasáže čestica hrane (**Broderick i sur., 1991**). Oni nam ne govore ništa o mikroorganizmima buraga te načinu i sudbini razgrađenog proteina (**Hobson i Jouany, 1988**).

Usprkos navedenim nedostacima in situ metoda je danas široko rasprostranjena i njome je procjenjena proteinska vrijednost velikog broja krmiva za preživače. Istovremeno je i ona predmet stalnog istraživanja i modificiranja.

Zato je i cilj ovoga rada predložiti standardnu proceduru u koju su uključene nove znanstvene spoznaje o djelovanju pojedinih faktora na njenu pouzdanost.

Prijedlog standardne in situ metode

Proposed standard in situ method

Na temelju iznijetog pregleda literature očito je da se in situ, kao i svaka druga kemijska i biološka, metoda nalazi u procjepu između želje da bude što preciznija, točnija i ponovljiva s jedne strane, te jednostavna, brza i jeftina s druge strane. Zato su svi pokušaji standardizacije kompromis između ova dva teško uskladiva zahtjeva i uzrok različitosti u pojedinim postupcima in situ metode.

Stoga na temelju ovoga pregleda literature, iznosimo prijedlog in situ metode.

Opis prijedloga standardiziranih postupaka in situ metode u procjeni razgradljivosti surovog proteina.

Description of the proposition of standardized in situ procedures used for estimation of crude protein degradability.

1. Priprema uzorka: *Sample preparation:*

1.1. Sušenje *Drying*

1.1.1. Sušenje uzoraka zrakosuhih krmiva (zrnevlje žitarica, proteinska krmiva, sijena i suhi nusproizvodi). *Drying of air – dry samples (cereals grains, protein supplements, hay and dried by – products).*

uzorak treba sušiti kada sadrži više od 15% vlage suši se u sušioniku na 60 °C kroz 48 sati

sample should be dried when containing more than 15% moisture in an oven drier at 60 °C for 48 hours.

1.1.2. Sušenje uzoraka zelene krme, silaža, sjenaža i sočnih krmiva.

Drying of samples of fresh forages, silages, wilted silage, roots and tubers.

sušenje zamrzavanjem
drying by freezing

1.2. Mljevenje *Milling*

– Voluminozna krma melje se kroz sito 2 mm u Wiley mlinu.
Forages milled through a 2 mm screen in a Wiley mill.

– Koncentratna krma melje se kroz sito 1 mm u Wiley mlinu.
Concentrates milled through a 1 mm screen in a Wiley mill.

2. Specifikacija vrećice *Bag specification*

2.1. Materijal vrećica *Bag material*

– Vrećice napraviti od poliestera, najlona ili drugog materijala koji neprobavljaju mikroorganizmi buraga.
Bags are made of polyester, nylon or other material which is not digestible by rumen microbes

2.2. Porozitet vrećica 40 – 50 μm *Bag porosity*

2.3. Dimenzije vrećice *Bag dimensions*

– Omjer širine i dužine vrećice 1 : 1.5
The width : length ratio of the bag 1 : 1.5

2.4. Dužina povezujuće uzice od fistule do vrećice *The length of the attaching cord from the rumen cannulae to the bag*

– 50 cm u buragu krava
50 cm in the rumen of cows

– 25 cm u buragu ovce
25 cm in the rumen of sheep

2.5. Istu vrećicu ne koristiti više od 3 – 4 puta *The same bag is not to used more than 3 – 4 times*

2.6. Veličina uzorka u odnosu na površinu vrećice *Sample size related to bag surface area*



- 10 – 15 mg po centimetru kvadratnom vrećice
10 – 15 mg per square centimetre of bag
3. Vrsta životinja
Animal species
- 3.1. Najmanje tri odrasla goveda, ovce ili koze.
A minimum of three mature cows, sheep or goats.
- 3.2. Ponavljanje
Replication
- Dvije vrećice se stavljaju u burag svake životinje za svako vrijeme inkubacije
Duplicated bags are placed in the rumen of each animal for each time of incubation
- 3.3. Kondicija životinje
Condition of animal
- Životinje trebaju biti u dobroj, ali ne u tojnoj kondiciji.
Animals should be in good, but not in condition of fatness.
- 4.0. Obrok
Diet
- 4.1. Preporučeni sastav osnovnog obroka suglasno Schiemanu (1981).
Recommended composition of the basal diet according to Schieman (1981).
- 4.1.1. Sijeno može biti jedino krmivo u pokusu ako mu je probavljivost OT između 55 i 75%
Hay can be fed alone in the trial if the digestibility of organic matter remain
- 4.1.2. ST obroka se treba sastojati od 70% sijena ili silaže i 30% koncentrata kada se procjenjuje razgradljivost proteina ostalih krmiva.
Dry matter of the diet should contain 70% of hay or silage and 30% of concentrates when the degradability of the other feedstuffs are estimated.
- 4.1.3. Krmna smjesa treba sadržavati ispitivano koncentratno, a osnovni obrok voluminozno krmivo (zelenu krmu, repe i gomoljače).
The concentrate mix should include tested concentrated feedstuff, while basal diet should contain tested roughages (fresh forages, silage, roots and tubers)
- 4.2. Obrok bi trebao sadržavati: surovih vlakna ≥ 180 g/kg ST surovog proteina (uključujući NPN) ≥ 120 g/kg ST i maksimum 200 g/kg ST; škroba ≥ 400 g/kg ST i šećera ≥ 200 g/kg ST.
- Diet should contain: crude fibre ≥ 180 g/kg DM; crude protein (including NPN) ≥ 120 g/kg DM; and maximum 200 g/kg DM; starch ≥ 400 g/kg DM and sugar ≥ 200 g/kg DM.*
- 4.3. Razina hranidbe treba biti blizu uzdržnih potreba.
Feeding level should be near maintenance level.
5. Određivanje topivog proteina korištenjem postupka Madsen i Hvelplud (1991).
Determining of soluble protein using procedure described by Madsen i Hvelplud (1991).
6. Trajanje inkubacija
Incubation time
- 6.1. Koncentrati, zelena krma, silaže, sjenaže repe gomoljače 0, 2, 4, 8, 16, 24 i 48 h.
Concentrates, fresh forages, silages, wilted silage, roots and tubers 0, 2, 4, 8, 16, 24 and 48 h.
- 6.2. Sijena kao u 6.1. i još 72 h.
Hay as in 6.1. and also 72 h.
- 6.4. Žetveni ostaci kao u 6.2. i još 96 h.
Crop residues as 6.2. and also 96 h.
7. Vrećice se stavljaju u burag u vrijeme hranjenja.
Bags are inserted in the rumen at feeding time.
8. Postupak pranja
Washing procedure
- Nakon svake inkubacije vrećice se peru u hladnoj vodi u stroju za pranje rublja kroz 15 min.
After each incubation bags are to be washed in cold water in washing machine for 15 min.
9. Mikrobna kontaminacija
Microbial contamination
- Korekciju za mikrobnu kontaminaciju sijena i ratarskih nusproizvoda prema jednadžbi **Michalet-Doreau i Old-Bah (1989)**
Razgr. = 6.4. – 0.365SB + 0.170NDV +/- 1.9.
Correction for microbial contamination hay and crop residues according to equation by Michalet-Doreau and Old-Bah (1989) Degr. = 6.4. – 0.365CP + 0.170NDF +/- 1.9.
10. Izračunavanje brzine oticanja čestica hrane iz buraga prema **Kristensen i Weisbjerg (1991)**
Brzina otjecanja digesta (h^{-1}) = k + 0.000864* razina hranidbe

Calculation of feed particle rumen outflow rate according to Kristensen i Weisbjerg (1991)

Rumen particle outflow rate (h^{-1}) = $k + 0.000864$ *feeding level

11. Izračunavanje efektivne razgradljivosti proteina prema eksponencijalnoj jednadžbi **Orskov i McDonald (1979)**
Calculation of effective protein degradability according to exponential equation by Orskov i McDonald (1979)

Literatura

1. **Abdalla, H.O., D.G. Fox, i P.J. Van Soest** (1988): An evaluation of methods for preservation fresh forage samples before protein fraction determination. *J. Anim. Sci.*, 66, 2646–2649.
2. **Alam, M.R., D.P. Poppi, i A.R. Sykes** (1983): Intake, digestibility and retention time of 2 forages by kids and lambs. *Proc. N. Z. Anim. Prod.*, 43, 119–121.
3. **ARC** (1980): The nutrient requirement of ruminant livestock. *Commonwealth Agricultural Bureaux*, Farnham Royal.
4. **ARC** (1984): The nutrient requirement of ruminant livestock. *Suppl. No 1. Commonwealth Agricultural Bureaux*, Farnham Royal.
5. **Aunschuss für Bedarfsnormen** (1965): Energie – und Nährstoffbedarf Landwirtschaftlicher Nutztier. No. 3, Milchkuhe und Aufzuchttrinder, *DLG-Verlag*, Frankfurt/Main, str. 92.
6. **Babnik, D.** (1989): Utjecaj termina košnje na kvalitetu proteina u sijenu kupčaste oštrice. *Magistarski rad*, 65, Zagreb.
7. **Bailey, C. B.** (Rates of digestion of swallowed and unswallowed dried grass in the rumen. *Can. J. Anim. Sci.*, 42, 49–54.
8. **Balch, J.L. i Johnson** (1950): Factors effecting the utilisation of food by cellulose in the rumen of cows. 2. Factors influencing rate of breakdown of cellulose in the rumen of cows. *Br. J. Nutr.*, 4, 69–91.
9. **Bernard, L.D., O. Marvalin, W. Yan, i C. Poncet** (1988): Colonisation bacterienne de different types d'aliments incubes in sacco dans le rumen: consequences pour l'estimation de la degradabilite de l'azote. *Reprod. Nutr. Deveop.* 21, 416–421.
10. **Boe, U.B.** (1989): The effect of silage to concentrate ratio on the nylon bag degradation of feedstuffs in the rumen of dsiry cow. *Norw. J. Agric. Sci.*, 3, 241–249.
11. **Broderick, G. a., R. J. Wallace, i E. R. Orskov** (1991): Control of rate and extent of protein degradation. In: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Proc. of Seventh International Symposium of Ruminant Physiology. Edited by Tsuda, T., Sasaki, Y. i R. Kawashima. 547–592. Academic Press inc. San Diego.*
12. **Chen, G., J.B. Russell, i C.J. Sniffen** (1987): A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate-limiting step in ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.*, 70, 983–992.
13. **Cherney, D.J.R., J.A. Patterson, i R.P. Lemenager** (1990): Influence of in situ bag rinsing technique on determination of dry matter disappearance. *J. Dairy Sci.*, 73, 391–397.
14. **Czerkawski, J.W.** (1986): An introduction to rumen studies. *Pergamon press*, Oxford, 231.
15. **Cottyn, B.G., De Beever i J.M. Vanacker** (1990): The estimation of nutritive value of dairy cattle feed. *Arch. Anim. Nutr.*, 40, 960–980.
16. **Demeyer, D. i R. Dendooven** (1987): Resultats related to in vitro and in sacco. Evaluation of ligncellulose digestion in ruminant. *Proceeding of the EEC seminar. The method at straw evaluation in ruminant feeding.* Clermont–Ferrand.
17. **Dhamoa, M.S.** (1988): On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass Forage Sci.*, 43, 441–444.
18. **Eiiman, M.E. i E.R. Orskov** (1984): Factor affecting the outflow of protein supplements from rumen. 1. Feeding level. *Anim. Prod.* 38, 45–51.
19. **Fahmy, S.T.M. i F. Sundstol** (1985): The degradability of untreated and chemically treated barley straw and of grass silage as influenced by the ration composition. *Z. Tierphysiol. Tiererahr. u. Futtermittelkde.* 53, 34–42.
20. **Faria, de V.P. i J.T. Huber** (1984): Influence of dietary protein and energy on disappearance of dry matter from different forage types from dacron bags suspended in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 59, 246–252.
21. **Figroid, W., Hale, W.H. i B. Theeurer** (1972): An evaluation of the nylon bag technique for estimating rumen utilisation of grains. *Proc. West. Sect. Amer. Soc. of Anim. Sci.*, 7, 265.
22. **Franklin, K.K., Winch, J.E. i G.K. MacLeod** (1981): The effect of concentrate on digestion of bromegrass constituents. *Can. J. Anim. Sci.*, 935–944.



23. **Fox, D.G., Sniffen, C.J., O'Conner, J.D., Russell, J.B. i P.J. Van Soest** (1990): Part I. A model for predicting cattle requirements and feedstuffs utilization. In: *The Cornell Net Carbohydrate and Protein System for Evaluation Cattle Diets*. Search: Agriculture, Ithaca, NY, Cornell Univ. Agr. Exp. Sta., 34, 128.
24. **Hobson, P. N. i J.P. Jouany** (1988): Models, mathematical and biological, of the rumen function. In: *The rumen microbial ecosystem*, (Ed. P. N. Hobson): Elsevier Appl. Sci., London, 461–512.
25. **Hof, G., Kouwenberg, W.J.A. i S. Tamminga** (1990): The effect of washing procedure on the estimation of the in situ disappearance of amino acids from feed protein. Academic Press, New York.
26. **Hungate, P.E.** (1966): The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
27. **Inra** (1978): Alimentation des Ruminants. INRA Publ., Versailles
28. **Kennedy, P.M., Hazlewood, G.P. i L.P. Milligan** (1984): A comparison of methods for the estimation of proportion of microbial nitrogen in duodenal digesta, and of correction for microbial contamination in nylon bags incubated in the rumen of sheep. Br. J. Nutr., 52, 403–417.
29. **Keuren, R.W. van, i W.W. Heihemann** (1962): Study of a nylon bag technique for in vitro estimation of forage digestibility. J. Anim. Sci., 21, 340–345.
30. **Krishnamoorthy, U., Sniffen, C.J. i P.J. Van Soest** (1982): Nitrogen fractionation in ruminant feedstuffs for feed evaluation. Proc. Cornell Nutr. Conf., 6, 95–102.
31. **Kristensen, E.S., Moller, P.D. i T. Hvelplund** (1982): Estimation of the effective protein degradability in the rumen of cows using the nylon bag technique combined with outflow rate. Acta Agric. Scand., 32, 123–127.
32. **Kristensen, V.F. i M.R. Wejsbjerg** (1991): 6. A new approach to feed evaluation for ruminants. Norv. J. Agric. Sci., Suppl., No 5, 5, 67–81.
33. **Lindberg, J.L.** (1991): 5. Analytical methods for energy evaluation. Norv. J. Agric. Sci., Suppl. 5, 59–65.
34. **Lindberg, J.E.** (1984): Nitrogen metabolism in sheep. 2. A comparison between rumen degradability of nitrogen and organic matter in sacco and in vivo in sheep fed rations with hay, barley and various protein supplements. Swedish J. agric. Res., 14, 37–43.
35. **Lindberg, J.E. i P.G. Knutsson** (1981): Effect of bag pore size on the loss of particular matter and on the degradation of cell wall fibre. Agric. Environm., 6, 171–182.
36. **Lindberg, J.E. i P. G. Knutsson** (1981): Effect of bag pore size on the loss of particular matter and on the degradation of cell wall fibre. Agric. Environm., 171–182.
37. **Lindberg, J.E. i T. Varvikko** (1982): The effect of bag pore size on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compound and cell wall in nylon bags. Swedish J. agric. Res., 17, 163–171.
38. **Maddox, T.L. i C.E. Polan** (1989): Degradation value for feedstuffs when ruminally suspended in bags of two porosities. J. Anim. Sci., 51, Suppl. 1, 379.
39. **McDonadi, I.** 1981): A revised models for the estimation of protein degradability in the rumen. J. Agric. Sci. (Camb.): 96, 252–252.
40. **Madsen, J. i T. Hvelplund** (1985): Protein degradation in the rumen. – A comparison between in nylon bag, in vitro and buffer measurements. Acta Agric. Scand. Suppl. 25, 103–273.
41. **Mangan, J.L.** (1972): Quantitative studies on nitrogen metabolism in the bovine rumen. The rate of proteolysis of casein and ovalbumin and the release and metabolism of free amino acids. Br. J. Nutr. 27, 261–273.
42. **Marinucci, T. M., B.H. Dehority i S.C. Loerch** (1992): In vitro and in vivo studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fibre bags, J. Anim. Sci., 70, 296–307.
43. **Mann, S.O. i E.R. Orskov** (1975): The effect of feeding whole or pelleted barley to lambs on their rumen bacterial populations and pH. Proc. Nutr. Soc., 34, 63A–64A.
44. **Mathers, J.C. i E.L. Miller** (1981): Quantitative studies of food protein degradation and the energetic efficiency of microbial protein synthesis in the rumen of sheep given chopped lucerne and rolled barley. Br. J. Nutr., 45, 587–602.
45. **Mehrez, A.Z. i E.R. Orskov** (1977): A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. J. agric. Sci. Camb., 88, 645–650.
46. **Meyer, R.L. i J.H. Mackie** (1986): Microbiology of feed samples incubated in nylon bags in the rumen of sheep. S. Afr. J. Anim. Sci., 13, 220–225.
47. **Michalet-Doreau, Brigitte, R. Verite i P. Chapoutot** (1987): Methodologie de mesure de la degradabilite in sacco de l'azote dans le rumen. Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, I.N.R.A. 69, 5–7.
48. **Michalet-Doreau, Brigitte** (1989): Use of in sacco method to predict the feeding value of forage. XVI Inter. Grassld. Congr., 4–11 October, Nica, 1850–1852.
49. **Michalet-Doreau, Brigitte** (1990): Variation of in sacco nitrogen degradability of green forages in rumen. 4th Annual Meeting in the EEAP. (Summary 228):.
50. **Michalet-Doreau, Brigitte i M.Y. Ould-bah** (1989): Estimation of the extent of bacterial contamination in bag residues and its influence on in sacco measurements of forage nitrogen degradation in rumen. XVI Inter. Grassld. Congr., 4–11 October, Nica, 909–910.
51. **Murphy, R.M. i J.M. Nicoletti** (1984): Potential reduction of forage and rumen digesta particle size by microbial action. J. Anim. Sci., 60, 1347–1351.
52. **NKJ** (1985): Introduction of the proposed Nordic system-the AAT-PBV system-into practice and future research requirements. Acta Agric. Scand. Suppl. 25.
53. **Nocek, J.E.** (1985): Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. J. Anim. Sci., 60, 1347–1352.

54. **Nocek, J.E.** (1988): In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. *J. Dairy Sci.*, 71, 2051–2069.
55. **Nocek, J.E.** i **J.E. English** (1986): In situ degradation kinetics; Evaluation of rate determination procedure. *J. Dairy Sci.*, 69, 77–87.
56. **Nocek, J.E.** i **A.L. Grant** (1987): Characterization of in situ nitrogen and fibre digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentages. *J. Anim. Sci.*, 64, 552–557.
57. **Oldman, J.D.** (1986): Testing and implementing the modern system: UK feed evaluation and protein requirements system for ruminants. *ECE-EAAP seminar*, Bruxelles.
58. **Olubolokum, J.A., W.M. Craig**, i **K.R. Pond** (1990): Effect of mastication and microbial contamination on ruminal in situ forage disappearance. *J. Animal Sci.*, 68, 3371–3381.
59. **Orskov, E.R.** i (1982): **Protein nutrition in ruminants.** *Academic Press INC*, London, str. 160.
60. **Orskov, E.R.** i **I. McDonald** (1979): The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weight according to rate of passage. *J. Agric. Sci. Camb.*, 92, 499–503.
61. **Orskov, E.R.** i **E.I. Miller** (1988): Protein evaluation in ruminants. In *Feed Science*, str., 103–127. (Ed. Orskov, E.R.): Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
62. **Owens, F.N.** (1985): Ruminant nitrogen usage. str. 138. *National Academy Press*, Washington, DC20418.
63. **Peyraud, J.L.** (1992): Influence du mode de sechage et de la finesse de broyage des echantillons de fourages sur l'estimation de la degradabilite de l'azote dans le rumen. 5th Conference on Nutrition and Feeding of Herbivores. (u štampi).
64. **Poppi, D.P., D.J. Minson**, i **J.H. Ternouth** (1980): Studies of cattle and sheep eat leaf and stem fraction of grass. 1. The voluntary intake, digestibility and retention time in the reticulo-rumen. *Herbivores*. (u štampi).
65. **Prigge, E.C., M.J. Baker**, i **G.A. Varga** (1984): Comparative digestion, rumen fermentation and kinetics of forage diets by steer and wethers. *J. Anim. Sci.*, 59, 237–245.
66. **Quinn, J.L., J.G. Wath, Van Der** i **S. Mayburgh** (1938): Studies of alimentary tract of Merino sheep in South Africa. IV. Description of experimental technique. *Onderstepoort J. of Vet. Sci. and Anim. Industry*. 14, 341–362.
67. **Robinson, P.H.** i **S. Tamminga** (1984): Present knowledge of protein digestion and absorption in ruminants *Ubers. Tierernahrung*, 12, 119–164.
68. **Schieemann, R.** (1981): Methodische Richtlinien zur Durchführung von Verdauungsversuchen für die Futterwertschutz. *Arch. Tierernahrung.*, 31, 1–32.
69. **Schoemann, E.A., P.J. De Wet**, i **W.J. Burger** (1972): The evaluation of the degradability of treated proteins. *Agroanimalia* 4, 35–46.
70. **Setälä, J.** (1983): The nylon bag technique in determination of ruminal feed protein degradation. *J. Sci. Agri. Soc. Finland* 55, 1–78.
71. **Siddons, R.C.** i **J. Paradine** (1981): Effect of diet on protein degrading activity in the sheep and cattle. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 973–981.
72. **Robinson, P.H., J.G. Fadel**, i **S. Tamminga** (1986): Evaluation of mathematical models to describe neutral detergent residue in terms of its susceptibility to degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci.*, 15, 249–271.
73. **Siddons, R.C.** i **J. Paradine** (1983): Protein degradation in the rumen of sheep and cattle. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 701–708.
74. **Staalén, Van W.M.** i **S. Tamminga** (1990): Protein degradation of rumen diets. In: *Feedstuff Evaluation* (eds. J. Wiesman i D.J.A. Cole), *Butterworths*, London, 55–72.
75. **Stern, M.D.** i **L.D. Satter** (1984): Evaluation of nitrogen solubility and the dacron bag technique as methods for estimating protein degradation in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 58, 714–724.
76. **Stritzler, N.P., T. Hvelplund**, i **J. Wolstrup** (1990): The influence of the position in the rumen on dry matter disappearance from nylon bags. *Acta Agric. Scand.*, 40, 363–366.
77. **Susmel, P., B. Stefanon, E. Piasentier**, i **M. Ovan** (1988): Effect of additives on rumen degradability of feed nitrogen. – 2. *Fats. Wiss. Z. WPU, Rostock N– Reihe*, 37, 75–76.
78. **Sutherland, T.M.** (1986): Particle separation in the forestomachs of sheep. In: *Aspects of Digestive Physiology in Ruminants* (desk. A. Dobson i M.J. Dobson) Comstock Publ. Assoc., Ithaca, Chapter 3.
79. **Tamminga, S., R. Ketelaar** (1986): Research on the degradability of proteins and carbohydrate fractions in concentrates and on the intestine digestion of proteins and carbohydrates escaping rumen digestion. *Jaarverslag 1986 IVVO*, 58.
80. **Tamminga, S., R. Ketelaar** i **A.M. van Vuuren** (1989): Degradation of nitrogen in conserved forage in the rumen of dairy cows. *Grass and Forage Sci.*, (u tisku)
81. **Tisserand, J.L.** (1989): Biological in vitro and in sacco. In: Evaluation of straws in ruminant feeding. (Ed; Chenost, M. i P. Reiniger), *Elsevier Applied Science*, London, 144–154.
82. **Uden, P.** (1978): Comparative studies on rate of passage, particle size and rate of digestion in ruminants, equines, rabbits and man. *Ph. D. thesis, Cornell University, Ithaca, NY*, str., 178.
83. **Uden, P., R. Parra**, i **P.J. Van Soest** (1974): Factors influencing reliability of nylon bag technique. *J. Dairy. Sci.*, 57, str. 79 (Abstr.)
84. **Uden, P.** i **P.J. Van Soest** (1984): Investigations of the in situ bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *J. Anim. Sci.*, 58, 213–219.
85. **Van Soest, P.J.** (1983): Nutritional ecology of the ruminant. *O & Books, Inc.*, Corvallis, Oregon.
86. **Varvikko, T.** i **J.E. Lindberg** (1985): Microbial nitrogen in nylon bag residues quantified by feed N¹⁵ dilution. *Br. J. I Nutr.*, 54, 473–482.
87. **Verite, R.** i **C. Demarquilly** (1978): Qualite des matieres azotees des aliments pour ruminants. In: *Vache Laitiere. INRA Publ. Versailles*, 143–158.



88. **Verite, R., M. Journet, i R. Jarrige** (1979): A new system for the protein feeding of ruminants: The PDI system. *Liv. Prod. Sci.*, 6, 349–367.
89. **Verite, R., B. Michalet-Doreau, P. Chapoutot, J.L. Peraud, i C. Poncet** (1987): Revision du systeme des Proteines Digestible dans l'Intestine (PDI). *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix I.N.R.A.*, 70, 19–34.
90. **Vuuren, A.M. van, S. Tamminga, i R.S. Keterlar** (1990): Ruminant availability of nitrogen and carbohydrates from fresh and preserved herbage in dairy cows. *Neth. J. Agric. Sci.*, 38, 499–512.
91. **Walt, van der J.G. i J.H.F. Meyer** (1988): Protein digestion in ruminants. *S. Afr. Tydskr. Vek.*, 18, 30–40.
92. **Warner, A.C.I.** (1981): Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. *Nutr. Abstr. Rev., Ser. B*, 54, 473–481.
93. **Zhang, Y. i L.D. Bunting** (1991): Solvent fraction and distribution of nitrogen (N) in annual ryegrass and berseem clover. *J. Anim. Sci., Suppl. 1, Abstr. 208*.
94. **Zinn, R.A., L.S. Bull, R.W. Hemken** (1981): Degradation of supplemental proteins in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 52, 857–866.

SUMMARY

In this review various factors of influence on protein degradability and its estimation by in sacco method are examined thoroughly. It has been discussed about essential procedures within a method are examined thoroughly. It has been discussed about essential procedures within a method which are carried out separately (e.g. sample preparation, bag porosity, sample size, bag manipulation, type of animal, basal diet, rumen particle outflow rate and effective degradability calculation). In spite of wide – spread usage, this standard method is still not accepted. Lacks of this method are also presented (e.g. particles of food are not reduced by mastication and rumination and are contaminated with microbial protein, soluble protein is not always totally digestible, degradability is not following the first order kinetic curve every time).

Presented proposition of standard in sacco method is based on critically reviewed literature.

Key words: Characteristics of in sacco methods, protein degradability, proposition of standard in sacco method.